· 论著 ·

捏脊法通过调节 BDNF 改善未成年哮喘大鼠学习记忆能力的机制研究

朱延[1，2]，熊英[2*]

1.223800 江苏宿迁，宿迁市中医院
2.210023 江苏南京，南京中医药大学针灸推拿学院
*通信作者：熊英，教授；E-mail：270428@njucm.edu.cn

【摘要】 **背景** 哮喘是儿童常见的慢性疾病，可引起反复发作的气道炎症，还可导致认知功能下降和学习记忆能力减退。捏脊法作为一种传统中医疗法，在改善哮喘症状和提高机体免疫功能方面展现出潜在的疗效，但其在调节学习记忆能力方面的机制尚不完全清楚。**目的** 探讨捏脊法改善未成年哮喘大鼠气道炎症及调节脑源性神经营养因子（BDNF）改善学习记忆能力的作用机制。**方法** 于2020年10—12月选取3~4周龄雄性SPF级SD大鼠40只为研究对象，将大鼠随机分为对照组（n=6）、模型组（n=7）、捏脊干预组（n=7）和甲基泼尼松龙组（n=7）。采用卵清蛋白（OVA）致敏和激发法建立未成年大鼠哮喘模型，分别以捏脊法和甲基泼尼松龙（MP）腹腔注射对哮喘造模过程进行干预，通过水迷宫检测大鼠学习记忆能力；全体扫描法检测增强呼吸间歇（Penh）值评估大鼠气道高反应；HE染色观察肺组织病理变化；酶联免疫吸附法（ELISA）检测血浆IgE和肺泡灌洗液（BALF）中干扰素-γ（IFN-γ）、白介素4（IL-4）、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）水平；免疫组化检测海马组织BDNF表达。**结果** 模型组大鼠Penh值、气道炎症评分、IgE、IL-4、TNF-α 和 IFN-γ 水平均高于对照组，海马组织BDNF水平以及学习记忆能力均低于对照组，差异有统计学意义（P<0.05）；捏脊干预组和甲基泼尼松龙组大鼠Penh值、气道炎症评分、IgE、IL-4、TNF-α 水平均低于模型组，差异有统计学意义（P<0.05）；且捏脊干预组BDNF表达及改善学习记忆能力效果优于甲基泼尼松龙组，差异有统计学意义（P<0.05）。**结论** 捏脊疗法可通过减轻炎症反应、提高哮喘大鼠海马区BDNF的表达改善大鼠学习记忆能力，在哮喘的治疗及认知功能恢复方面具有潜在的应用价值。

【关键词】 哮喘；捏脊法；学习记忆；脑源性神经营养因子；气道炎症
【中图分类号】 R562.25 【文献标识码】 A DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0393.

Mechanisms by which chiropractic Therapy Improves Learning and Memory in immature rats with asthma by Modulating BDNF

ZHU Yan[1，2]，*XIONG Ying*[2*]
1.Suqian Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine，Suqian 223800，China
2.Acupuncture and Massage College，Nanjing University of Chinese Medicine，Nanjing 210023，China
**Corresponding author：XIONG Ying，Professor；E-mail：270428@njucm.edu.cn*

【Abstract】 **Background** Asthma is a common chronic disease in children that can cause recurrent airway inflammation and lead to cognitive dysfunction and memory impairment. Chiropractic therapy，a traditional Chinese medicine treatment，has shown potential therapeutic effects in improving asthma symptoms and enhancing immune function，but its mechanism in regulating learning and memory abilities is not fully understood. **Objective** To explore the mechanism by which chiropractic therapy improves airway inflammation in adolescent asthmatic rats and regulates brain-derived neurotrophic factor（BDNF）to improve learning and memory abilities. **Methods** From October to December 2020，40 male SPF-grade SD rats aged 3-4 weeks were selected as research subjects and randomly divided into control group（n=6），model group（n=7），

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81973970）；宿迁市科技计划资助项目 / 宿迁市中医院青年托举项目（K202401）
引用本文：朱延，熊英．捏脊法通过调节 BDNF 改善未成年哮喘大鼠学习记忆能力的机制研究［J］. 中国全科医学，2024. DOI：10.12114/j.issn.1007-9572.2024.0393.［Epub ahead of print］［www.chinagp.net］
ZHU Y，XIONG Y. Mechanisms by which chiropractic Therapy Improves Learning and Memory in immature rats with asthma by Modulating BDNF［J］. Chinese General Practice，2024.［Epub ahead of print］

chiropractic therapy intervention group (n=7), and methylprednisolone group (n=7). An adolescent asthma rat model was established using ovalbumin (OVA) sensitization and challenge, and the asthma modeling process was intervened with chiropractic therapy and methylprednisolone (MP) intraperitoneal injection. Learning and memory abilities of the rats were assessed using the water maze test; Airway hyperresponsivenesse was valuated by measuring enhanced pause (Penh) values via whole-body plethysmography; Pathological changes in lung tissue were observed with HE staining; Levels of plasma IgE and interferon-γ (IFN-γ), interleukin-4 (IL-4), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Immunohistochemistry was used to detect BDNF expression in the hippocampal tissue. **Results** The model group rats had higher Penh values, airway inflammation scores, IgE, IL-4, TNF-α, and IFN-γ levels compared to the control group, and lower hippocampal BDNF levels and learning and memory abilities, with statistically significant differences (P<0.05); The chiropractic therapy intervention group and the methylprednisolone group rats had lower Penh values, airway inflammation scores, IgE, IL-4, and TNF-α levels compared to the model group, with statistically significant differences (P<0.05); Moreover, the chiropractic therapy intervention group showed superior BDNF expression and improved learning and memory abilities compared to the methylprednisolone group, with statistically significant differences (P<0.05). **Conclusion** Chiropractic therapy therapy can improve learning and memory abilities in asthmatic rats by reducing inflammatory responses and increasing the expression of BDNF in the hippocampus, showing potential application value in the treatment of asthma and the recovery of cognitive functions.

【Key words】 Asthma; Chiropractic therapy; Learning and memory; Brain-derived neurotrophic factor; Airway inflammation

哮喘是儿童常见呼吸系统慢性疾病之一。哮喘的喘息、胸闷等症状，易使患儿产生自卑、恐惧等心理障碍，同时哮喘的反复发作，更易诱发患儿焦虑、抑郁等情绪，严重影响患儿的生活质量和学习能力[1]。有研究指出，哮喘会引起认知功能的减退以及学习记忆能力的下降[2]。研究表明，神经营养因子，尤其是脑源性神经营养因子（BDNF），在神经元可塑性以及与学习和记忆相关的生理和形态形成过程中具有重要作用，BDNF 信号通路也是参与学习记忆细胞机制的关键，其表达水平的改变可能与哮喘引发的认知功能障碍有关[3，4]。

目前，哮喘的临床治疗主要使用糖皮质激素、β2 受体激动剂、白三烯受体拮抗剂等药物，这些在儿童临床用药中常伴有较强的不良反应。小儿推拿是以中医基础理论为指导，运用手法作用于特定穴位以治疗疾病的一种中医外治疗法，其中捏脊法是小儿推拿中防治儿童哮喘的常用有效手法[5]。前期研究发现，捏脊法可以抑制哮喘大鼠肺部的炎症，并促进其消退[6]。此外，相关研究表明捏脊法能够改善大鼠学习记忆能力，并缓解焦虑等心理问题[7，8]。捏脊法作为一种传统中医疗法，已在改善哮喘症状和提高机体免疫功能方面展现出潜在的疗效。但其具体的作用机制，尤其是在调节学习记忆能力方面的机制尚不完全清楚。本研究利用未成年大鼠建立哮喘模型，并采用捏脊法进行干预，以评估捏脊法对哮喘大鼠学习记忆能力和气道炎症反应的影响，探讨其调节 BDNF 表达的潜在机制，旨在为捏脊法治疗哮喘及其相关认知功能障碍提供了新的实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 研究时间 自 2020 年 10—12 月。

1.1.2 实验动物 SPF 级 SD 大鼠，雄性，3~4 周龄，体重 45~55g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司，生产许可证号：SCXK（沪）2022-0004，动物质量合格证编号：20170005033601。在 SPF 级动物屏障环境饲养，予常规饲料及饮用水。本研究经南京中医药大学动物伦理委员会审查和批准（批号：202004A030），并在实验过程中严格遵守《实验动物的护理和使用指南》相关条款。

1.1.2 主要试剂 卵清蛋白（Ovalbumin，OVA，sigma 公司；货号：A5503）、乙酰胆碱（acetylcholine，Ach；美国 Sigma 公司，货号：A2251）；AL（OH）3（陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司，货号：BS010）；甲基泼尼松龙（methylprednisolone，MP，国药集团，国药准字 H20070007）；白介素 4（Interleukin，IL-4，Bioswamp 公司；货号：RA20088）、免疫球蛋白 E（Immunoglobulin，IgE，Bioswamp 公司；货号：RA20089）、肿瘤坏死因子-α（Tumor Necrosis Factor，TNF-α，Bioswamp 公司；货号：RA20035-S）、干扰素-γ（Interferon，IFN-γ，Bioswamp 公司；货号：RA20684-S）；TRIZOL 和逆转录试剂盒（南京诺唯赞生物科技股份有限公司；货号：R401-01 和 R232-01）；兔抗大鼠 BDNF 多克隆抗体和

DAB 显色液（北京博奥森生物公司；货号：DF6387 和 KGP1045-100）；PCR 引物（上海捷瑞生物工程有限公司）；qPCR 试剂盒（上海翌圣生物科技股份有限公司；货号：11141ES60）。

1.1.3 主要仪器 全身容积描记仪（法国 EMKA Technologies，型号：EMKA-WBP）；行为学检测系统（由南京中医药大学针药结合教育部重点实验室提供，型号：TopScan Gene&I）；PCR 仪（瑞士罗氏集团，型号：LightCycler96）；超声雾化器（江苏鱼跃医疗设备股份有限公司；型号：402AI）；KD-2800 型切片机（上海亿欣生物科技有限公司；型号：KD-2800）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及造模 将大鼠随机分为正常对照组（n=6）、哮喘模型组（n=7）、捏脊干预组（n=7）和甲基泼尼松龙组（n=7），参考文献[8-10]方法造模，具体如下：在实验开始的第 1、8 d 和 15 d，于大鼠腹腔注射 1 mL OVA/AL(OH)3 混合液[含 OVA 2 mg，AL(OH)3 40 mg]致敏。致敏结束后第 22 d 开始，使用超声雾化器将 2% OVA 喷洒到自制的透明有机玻璃箱中，并让大鼠吸入，每次持续 30 min，隔日进行，共 3 周。行为学实验前，连续 2 d 给予 3% OVA 加重激发。正常对照组使用生理盐水代替 OVA 进行相同操作步骤和时间的致敏和激发处理。

1.2.2 干预方法 （1）捏脊干预：用手掌轻轻托住大鼠，并用手指轻握将其固定，另一手拇指与食指中指相对，捏住皮肤，然后交替使用食指和中指向前推动（保证大鼠逐渐适应，没有过度挣扎或尖叫）。先自上而下抚摸 5 遍（抚摸速度：约 5 cm/s，压力：约 5 N，由美国压力剖面系统公司 Finger TPS 系统检测），然后进行捏脊法操作 15~20 次（前 3 周 15 次，后 3 周增加至 20 次以防止出现手法耐受，压力：约 12 N），最后再抚摸 5 次，从正式实验第 1 d 开始，每天上午 9 时操作，至激发结束。正常对照组、哮喘模型组和甲基泼尼松龙组每日施以同样的抓握数次。（2）甲基泼尼松龙组：大鼠在隔日激发前 30 min 腹腔注射甲基泼尼松龙（生理盐水溶解为 2 mg/mL 浓度注射液，根据 10 mg/kg 用量给予大鼠腹腔注射），至激发结束。其余组腹腔注射均以生理盐水代替甲基泼尼松龙。

1.2.3 一般情况观察 每日观察大鼠行为、毛发及粪便等情况并记录，至激发结束后 2 d 取大鼠肺泡灌洗液、肺组织、脑组织和血浆。

1.2.4 行为学检测 在取材前 6 d 开始，对各组大鼠进行水迷宫测试，每天各进行 1 次。

定位航行实验：向水槽中注水至漫过平台约 2 cm，先从任一象限边缘处将大鼠放入水中，4 个象限依次进行，保证每只大鼠每个象限间隔 30 min，连续 4 d。若大鼠在自由游泳 2 min 内找到圆形平台并停留 5 s，则记录下所用时间；若大鼠没有在 2 min 内找到平台，则记录逃避潜伏期为 2 min。计算 4 个象限潜伏期的平均值作为当天大鼠的潜伏期。

空间探索实验：定位航行实验结束后，随机选择一个象限将大鼠放入采集数据，操作同定位航行实验。计算机摄像并记录定位航行实验的潜伏期，空间探索实验的穿越平台象限次数和游泳速度。

1.2.5 肺通气功能测定 将大鼠放入全体容积描计箱内，分别以浓度为 0、3.125、6.25、12.5、25、50 mg/mL 的 Ach 激发雾化 2 min，测定各浓度 Ach 激发后 5 min 内大鼠增强呼吸间歇（enhanced pause，Penh）数值的变化。肺通气功能测定时间为取材前 1 d，各进行 1 次。

1.2.6 肺组织 HE 染色 肺组织完全浸泡于 4% 多聚甲醛中密封固定 48 h，随后用连续梯度的无水乙醇将组织脱水、再以二甲苯将组织透明并浸蜡处理。包埋冷却蜡块，选择适当的厚度（约 5~8 μm）切片并固定后烘干。二甲苯、无水乙醇将样本脱蜡水化，苏木素染色 5 min，流水冲洗，再以 1% 盐酸酒精分色 1~2 s，水中静置 10 min，伊红染色 3 min。二甲苯、无水乙醇脱水后中性树胶封片，镜检。每张切片在 200× 镜下随机选择 3~4 个包含细小支气管的视野，对大鼠肺组织炎症情况进行评分，0 分：没有炎症细胞；1 分：少量散在炎症细胞；2 分：炎症细胞形成环状，层厚为 1 个细胞；3 分：炎症细胞形成环状，层厚为 2~4 个细胞；4 分：炎症细胞形成环状，层厚为 >4 个细胞。

1.2.7 免疫组化检测 以 20% 乌拉坦麻醉后（0.5 ml/100 g）腹腔注射麻醉大鼠，脑组织取出后以 4% 多聚甲醛于 4℃固定 48 h。取固定好的海马脑组织，修饰、石蜡包埋并连续切片（厚度 6 μm）。切片 80 ℃烘烤机上烘烤 2 h，使其牢固于玻片上，60 ℃恒温烤箱中过夜。切片脱蜡后置柠檬酸钠抗原修复液中修复。5% 牛血清白蛋白（BSA）温育，依次滴加一抗（4 ℃孵育 13~15 h）、二抗（37 ℃，30min）后脱水、封片。每组大鼠取 4~5 样切片，通过 Image-ProPlus60 软件观察海马体齿状回旁区 1 区（CA1 区）和齿状回（Dentate Gyrus，DG）区，选取不重复的 3~5 个视野分析并记录每张免疫组化图片的平均光密度值，取平均值作为样本的统计值。

1.2.8 ELISA 检测 利用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠肺泡灌洗液（Bronchoalveolar Lavage Fluid，BALF）中 IFN-γ、IL-4、TNF-α 水平和血浆 IgE 水平。按照实验需要，在酶标板上设计好标准品孔、空白孔和样本孔，分别加入标准品、样品或稀释液，保证每孔加样均匀。经加酶、温育、洗涤、显色操作后终止反应，以空白孔调零，450 nm 波长测量各孔的吸光度（OD 值），根据标准曲线得出的公式算出各孔样本浓度。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据分析。使用 GraphPad Prism 8.0 软件作图。符合正态分布计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，组内治疗前后比较采用 Dunnett-t 检验；计数资料以相对数表示，组间比较采用 χ^2 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较

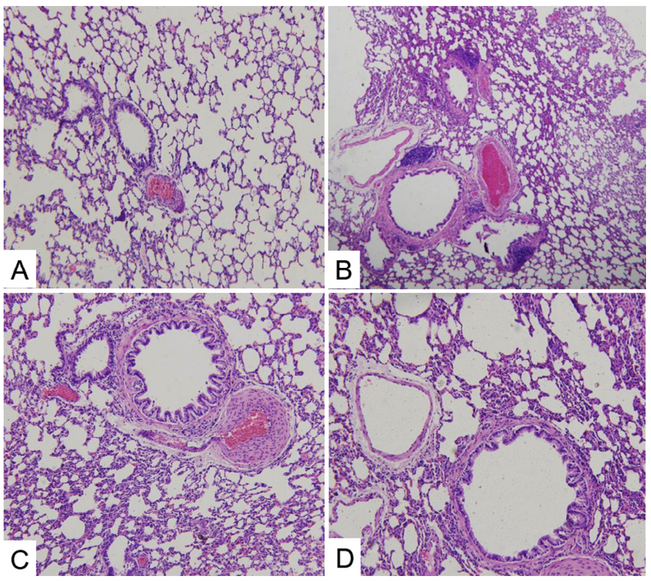
模型组大鼠中，挠鼻 6 例（85.7%），喘息 7 例（100%），呼吸增快 7 例（100%），烦躁不安 5 例（71.4%），伴随泡沫样分泌物从鼻腔中流出 4 例（57.1%），精神萎靡 6 例（85.7%），紫绀 3 例（42.9%），部分大鼠因过度挠抓造成指甲出血 2 例（28.6%）；捏脊干预组大鼠仅偶见轻微症状，其中挠鼻 2 例（28.6%），鼻翼扇动 1 例（14.3%），呼吸急促 3 例（42.9%），腹肌收缩 2 例（28.6%）；甲基泼尼松龙组大鼠，挠鼻 1 例（14.3%），鼻翼扇动 1 例（14.3%），呼吸急促 2 例（28.6%），腹肌收缩 1 例（14.3%）。

2.2 气道高反应变化比较

当 Ach 浓度为 3.13、6.26、12.5 mg/mL 时，各组大鼠 Penh 值差异均无统计学意义（P>0.05）；Ach 浓度为 25、50 mg/ml 时，模型组 Penh 值均高于对照组，差异有统计学意义（P<0.05）；捏脊干预组在 Ach 浓度为 25、50 mg/ml 时，Penh 值低于哮喘模型组，高于对照组，差异均有统计学意义（P<0.05）；甲基泼尼松龙组在 Ach 浓度为 25、50 mg/ml 时，Penh 值亦低于模型组（P<0.05），但与对照组相比，差异无统计学意义（P>0.05），见表 1。

2.3 肺组织病理学改变及评分

正常对照组大鼠肺组织形态结构未见明显异常，肺泡及肺泡间隔形态结构基本正常，支气管管腔规则，偶见炎性细胞浸润；哮喘模型组大鼠肺组织细小支气管壁及周围有炎性细胞浸润，内有粘液，支气管壁增厚，气道黏膜出现水肿，肺组织较致密，淋巴滤泡增大；捏脊干预组、甲基泼尼松龙组与哮喘模型组比较，炎性细胞浸润程度明显改善，气道黏膜水肿减轻，肺组织结构较清晰，支气管管腔规则，见图 1。哮喘模型组、捏脊干预组和甲基泼尼松龙组的气道炎症评分高于对照组，差异均具有统计学意义（P<0.05）；捏脊干预组和甲基泼尼松龙组的气道炎症评分低于模型组，差异均具有统计学意义（P<0.05），见表 2。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为捏脊干预组，D 为基泼尼松龙组。

图 1 肺组织 HE 染色（100×）

Figure 1 HE staining of lung tissue

2.4 血浆 IgE 及 BALF 中 IFN-γ、IL-4、TNF-α 水平比较

模型组、捏脊模型组和甲基泼尼松龙组 IgE 水平均高于对照组，差异有统计学有意义（P<0.05）；捏脊干预组和甲基泼尼松龙组 IgE 水平与模型组相比差异无统计学意义（P>0.05），见表 3。

模型组 BALF 中 IFN-γ 水平低于对照组，IL-4 和 TNF-α 水平高于对照组，差异均有统计学有意义（P<0.05）。捏脊干预组、甲基泼尼松龙组 BALF 中 IFN-γ 水平与模型组相比，差异无统计学意义

表 1 不同浓度 Ach 激发时各组大鼠 Penh 值比较（$\bar{x} \pm s$）

Table 1 Penh values comparison of rats in each group at different concentrations of Ach excitation

组别	例数	3.125 mg/mL Ach	6.25 mg/mL Ach	12.5 mg/mL Ach	25 mg/mLAch	50 mg/mL Ach
对照组	6	1.11±0.18	2.81±0.58	4.88±0.36	4.91±0.94	5.11±0.27
模型组	7	1.54±0.70	2.64±0.35	4.66±0.73	7.46±0.7[a]	8.24±0.57[a]
捏脊干预组	7	1.34±0.73	2.82±0.56	4.81±0.73	4.14±0.84[b]	5.07±0.37[b]
甲基泼尼松龙组	7	1.02±0.16	2.62±0.46	4.63±0.14	4.26±0.16[b]	5.15±0.46[b]
F 值		1.35	0.322	0.301	32.83	88.48
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

注：Penh= 增强呼吸间歇，Ach= 乙酰胆碱；a 表示与对照组相比，P<0.05，b 表示与模型组相比 P<0.05。

敏性疾病与焦虑、多动、学习能力的下降等心理行为及认知问题密切相关[9]，已成为具有代表性的儿童心身疾病。哮喘发病的长期性、反复性和长期药物治疗，不仅影响患儿的身体健康，更会导致患儿心理和智力上的

表 2 肺组织 HE 染色病理评分比较（$\bar{x}\pm s$，分）
Table 2 Pathological scores of HE staining in lung tissues

组别	例数	病理评分
对照组	6	0.75 ± 0.20
模型组	7	2.25 ± 0.45[a]
捏脊干预组	7	1.75 ± 0.32[ab]
甲基泼尼松龙组	7	1.60 ± 0.52[ab]
F 值		15.57
P 值		[P]<0.05

注：[a] 表示与对照组相比，$P<0.05$，[b] 表示与模型组相比 $P<0.05$。

（$P>0.05$），IL-4 和 TNF-α 水平低于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表 3。

2.5 空间学习记忆能力比较

对照组和捏脊干预组的潜伏期逐日递减，模型组的潜伏期在第 1~3 d 呈逐日递减趋势，第 4 d 出现了回升，甲基泼尼松龙组则在第 3 d 出现了回升。模型组、捏脊干预组和甲基泼尼松龙组大鼠第 4 d 的潜伏期及穿越平台次数与对照组相比，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；捏脊干预组大鼠第 4 天潜伏期低于模型组，穿越平台次数高于模型组，差异均有统计学意义（$P<0.05$），见表 4。

2.6 大鼠海马组织 BDNF 水平比较

模型组大鼠 CA1 和 DG 区的 BDNF 表达水平均低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；捏脊干预组

表 3 血浆 IgE 及 BALF 中 IFN-γ、IL-4、TNF-α 水平及比较（`x ± s）
Table 3 Plasma IgE levels in BALF and IFN-γ, IL-4, and TNF-α levels in BALF of rats in each group

组别	例数	IgE（μg/mL）	IFN-γ（pg/mL）	IL-4（pg/mL）	TNF-α（pg/mL）
对照组	6	15.81 ± 2.18	1437.12 ± 156.84	57.71 ± 5.24	181.35 ± 24.77
模型组	7	21.14 ± 2.70[a]	1203.34 ± 157.29[a]	80.95 ± 8.79[a]	257.37 ± 29.83[a]
捏脊干预组	7	18.84 ± 2.73[ab]	1326.80 ± 176.46	68.81 ± 9.19[ab]	221.83 ± 27.49[ab]
甲基泼尼松龙组	7	20.02 ± 2.16[a]	1281.35 ± 155.57	71.56 ± 9.01[ab]	215.01 ± 21.61[ab]
F 值		5.50	2.36	8.52	9.25
P 值		<0.05	>0.05	<0.05	<0.05

注：IgE= 免疫球蛋白 E，BALF= 支气管肺泡灌洗液，IFN-γ= 干扰素 γ，IL-4= 白细胞介素 4，TNF-α= 肿瘤坏死因子 α；[a] 表示与对照组相比，$P<0.05$，[b] 表示与模型组相比 $P<0.05$。

表 4 大鼠学习记忆能力比较（x ± s）
Table 4 Comparison of learning memory ability of rats detected by water maze

组别	例数	定位航行潜伏期（s）				穿越平台次数（次）
		1 d	2 d	3 d	4 d	
对照组	6	73.5 ± 7.5	47.4 ± 5.3	42.3 ± 5.5	35.8 ± 8.3	6.1 ± 2.3
模型组	7	66.4 ± 4.7	45.3 ± 5.7	38.4 ± 6.5	45.4 ± 8.7	4.4 ± 3.3
捏脊干预组	7	51.2 ± 6.3	43.8 ± 5.3	37.2 ± 6.7	21.8 ± 7.3[b]	7.8 ± 2.4[b]
甲基泼尼松龙组	7	58.3 ± 5.1	44.1 ± 6.1	45.3 ± 5.7	40.1 ± 8.1	6.1 ± 2.1
F 值		7.28	5.73	3.95	10.88	2.02
P 值		>0.05	>0.05	>0.05	<0.05	>0.05

注：a 表示与哮喘模型组相比 $P<0.05$。b 表示与模型组相比 $P<0.05$。

和甲基泼尼松龙组与对照组相比，差异均无统计学意义（$P>0.05$）；捏脊干预组 CA1 和 DG 区的 BDNF 水平均高于模型组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；甲基泼尼松龙组 CA1 区的 BDNF 水平高于模型组，差异有统计学意义（$P<0.05$），DG 区与模型组相比，差异无统计学意义（$P>0.05$），见表 5。

表 5 大鼠海马组织 BDNF 水平比较（`x ± s）
Table 5 Comparison of BDNF levels in hippocampal tissue of rats

组别	例数	CA1 区	DG 区
对照组	6	0.40 ± 0.01	0.41 ± 0.01
模型组	7	0.32 ± 0.01[a]	0.36 ± 0.01[a]
捏脊干预组	7	0.41 ± 0.02[b]	0.42 ± 0.02[b]
甲基泼尼松龙组	7	0.38 ± 0.01[b]	0.38 ± 0.01
F 值		73.85	34.23
P 值		<0.05	<0.05

注：BDNF= 脑源性神经营养因子，CA1 海马体齿状回旁区 1 区，DG= 齿状回区；[a] 表示与对照组相比，$P<0.05$，[b] 表示与模型组相比 $P<0.05$。

3 讨论

哮喘是儿童最常见的呼吸系统慢性疾病之一，由多种环境和基因因素共同作用所致。研究表明，哮喘等过

发育障碍，对患儿学习记忆能力产生影响。研究指出哮喘与儿童记忆困难有关，且哮喘发作时儿童年龄越小，记忆困难情况可能会更严重，并可能扩展到执行功能能力[10]。捏脊法等背部推拿手法具有调节下丘脑－垂体－肾上腺（hypothalamic-pituitary-adrenal，HPA）轴，缓解焦虑、抑郁等心理问题的作用，也可改善学习记忆能力，其具体机制尚不明确。

研究证明，哮喘与嗜酸性粒细胞、淋巴细胞等炎症细胞关系密切[11]。过敏体质、所处的环境和过敏原也是引发哮喘的重要因素[12]。Th1/Th2 比例失衡也是哮喘发作的重要原因。在哮喘发作过程中，Th2 细胞表现出优势应答，Th2 分泌的 IL-4 细胞因子抑制 Th1 分泌的 IFN-γ 细胞因子水平，从而诱导 B 细胞分泌 IgE 与肥大细胞结合，进一步诱导炎症因子 TNF-α 的水平升高，同时引起肥大细胞脱颗粒，导致气道粘液高分泌、气管增厚、气道收缩等引发哮喘[13-14]。本研究发现，模型组大鼠出现挠鼻、喘息、呼吸增快等症状，严重者鼻腔可见泡沫样分泌物或精神萎靡，而捏脊干预组大鼠症状轻微。捏脊干预组在 Ach 浓度为 25、50 mg/ml 时，Penh 值低于模型组，且与哮喘模型组相比，捏脊干预组气道炎症评分下降，且 BALF 中 IL-4 和 TNF-α 降低，表明捏脊法可在一定程度上抑制 Th2 优势的过敏性气道炎症，从而缓解哮喘症状，其途径可能是通过改善 Th1/Th2 比例失衡实现的，该结果与唐徐韵等[15]的研究结果一致。IgE 是介导过敏性疾病的重要免疫分子，临床研究表明，哮喘患者外周血中 IgE 与 IL-4 水平呈正相关[16]。因此 Th1/Th2 比例失衡与 IgE 水平升高有重要联系。本研究结果显示，哮喘模型组、捏脊模型组 IgE 水平均高于对照组，且捏脊干预组 IgE 水平低于模型组，与张丽娟[17]等的临床研究结果相符。IgE 和 TNF-α 水平升高，可能与 IgE 介导的免疫反应有关，当变应原（抗原）侵入机体时，B 细胞被激活，并产生大量 IgE，经过一系列反应，使机体处于致敏状态，当机体再次接触相同变应原（抗原）时，免疫反应被激活，诱导已致敏肥大细胞脱颗粒并释放 TNF-α 等活性介质[18]。

哮喘等过敏性疾病已被证实可增加神经精神障碍风险[19]，这些疾病不仅使哮喘儿童在言语智商和注意力水平方面显著低于健康儿童，而且会导致患儿产生学习困难、认知能力低下等问题。有研究证实，在某些特定细胞的帮助下，外周 T 细胞可跨越结构和通透性被破坏的血脑屏障向中枢的浸润，最终导致慢性中枢神经系统炎症和神经退行性变[20]。中枢神经系统炎症不仅会造成海马炎症，更会对海马功能造成损伤。目前认为，海马结构特别是 CA1 区与空间辨别及学习记忆关系最为密切，并认为是认知功能相关的重要脑区，直接参与信息的贮存和处理[21]。海马 CA1 区神经元的存活数量直接影响神经元突触的可塑性及海马对信息的处理和传递，从而影响学习和记忆过程。BDNF 是神经营养因子家族的重要成员，广泛表达于中枢神经系统中，并且大量富集于大脑海马和皮质中，对神经元的分化、生长和生存起重要作用。BDNF 不仅能够修复损伤的神经元，还能调节突触可塑性，参与学习和记忆的过程，并且在受损的学习、记忆能力中起到改善作用 。有研究表明，脑组织缺血可以刺激内源性 BDNF 表达上升，具有自我保护作用，促进受损神经元细胞修复，加速分化及再生过程，并抑制细胞死亡[22，23]。推拿手法或可调节 BDNF 的表达，改善神经元受损[24]。本研究结果显示，捏脊干预组大鼠在两区域的 BDNF 表达水平均高于模型组，表明在进行捏脊干预后，哮喘大鼠的学习记忆能力得到明显改善，说明捏脊法可调节 BDNF 表达，发挥保护和修复神经元的作用，具体分子机制仍需进一步研究。

中医学观点认为，哮喘的发展与肺脾肾等内脏功能不足密切相关，捏脊法主要操作督和膀胱经，促进人体精气的产生、平衡阴阳、畅通经络、调整气血循环，从而达到预防疾病和治疗疾病的效果[25]。本研究水迷宫实验中，4 组大鼠的潜伏期虽然有所波动，但是整体上呈逐日递减趋势，与哮喘模型组相比，捏脊干预组大鼠第 4 d 潜伏期缩短，穿越平台次数显著增加，表明模型组大鼠的定位航行和空间探索能力下降，而经过捏脊干预大鼠这些能力则得到改善。

本研究的局限性：（1）本研究对于捏脊法调节 BDNF 以改善儿童哮喘学习记忆能力的相关机制的探索尚处于初级阶段，所用样本量较小。（2）造模过程较长（约 45 d），伴随着大鼠身体的成长，其自身抵抗力、记忆力也在增长，是否对结果产生影响，仍需进一步研究。（3）本研究未能探索捏脊法在不同哮喘模型和不同发病阶段中的作用机制，揭示其多层次、多环节的调节作用。（4）本研究仅关注了大鼠海马 CA1 区和 DG 区域，而与认知障碍密切相关的其他大脑区域，例如前额叶皮质和外侧缰核未观察。（5）水迷宫实验需要消耗大鼠大量体力，可能导致大鼠出现缺氧等情况，大脑作为全身消耗氧气量最大的组织器官，氧气的缺乏也会造成脑组织出现结构功能损伤，导致认知功能等精神行为发生改变。大鼠是否因为出现缺氧而出现记忆下降，也需要进一步探索。

综上所述，捏脊法可以通过上调 BDNF 在海马 CA1 区和 DG 区的表达，改善哮喘大鼠学习记忆能力，其机制与捏脊法能够通过调节减轻炎症，抑制炎症对中枢神经系统，尤其是对海马的损伤有关。捏脊法是一种安全、有效、无副作用的健康替代疗法，其在哮喘及相关认知功能障碍治疗中具有潜在价值。

作者贡献：熊英提出主要研究目标，负责研究的构

思与设计，论文的修订；文章的质量控制与审查，对文章整体负责，监督管理。朱延负责研究的实施，撰写论文，数据的收集与整理，统计学处理，图、表的绘制与展示。

本文无利益冲突。

参考文献

[1] 洪建国.我国儿童哮喘诊治现状和思考［J］.四川大学学报：医学版，2021，52（5）：725-728. DOI：10.12182/20210960201.

[2] 任蒙丽.过敏性哮喘模型小鼠认知功能的改变及其机制研究［D］.重庆：重庆医科大学，2021. DOI：10.27674/d.cnki.gcyku.2021.000390.

[3] RAHMAN M，LUO H Y，SIMS N R，et al. Investigation of mature BDNF and proBDNF signaling in a rat photothrombotic ischemic model［J］. Neurochem Res，2018，43（3）：637-649. DOI：10.1007/s11064-017-2464-9.

[4] CHEN X J，WANG X Y，TANG L Y，et al. Nhe5 deficiency enhances learning and memory via upregulating Bdnf/TrkB signaling in mice［J］. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet，2017，174（8）：828-838. DOI：10.1002/ajmg.b.32600.

[5] 樊璞.基于海马-HPA轴探讨捏脊法预防CUMS致青少年期鼠抑郁的效应机制研究［D］.南京中医药大学，2022.DOI:10.27253/d.cnki.gnjzu.2022.000798.

[6] 熊英，沈楚楚，樊璞，等.捏脊法对脾虚哮喘大鼠肠道菌群和肺部炎症的影响［J］.中医杂志，2018，59（1）：61-65. DOI：10.13288/j.11-2166/r.2018.01.015.

[7] 钱星羽.捏脊疗法干预幼龄厌食大鼠及调控下丘脑摄食中枢的效应与机制研究［D］.天津：天津中医药大学，2023. DOI：10.27368/d.cnki.gtzyy.2023.000212.

[8] 龚梦华，吴倩雯，李一纯，等.捏脊疗法对自闭症模型大鼠焦虑样行为及NF-κB通路的影响［J］.云南中医中药杂志，2023，44（4）：81-85. DOI：10.16254/j.cnki.53-1120/r.2023.04.006.

[9] 张洋，侯伟.儿童支气管哮喘心理行为问题研究进展［J］.中国儿童保健杂志，2019，27（5）：523-526. DOI：10.11852/zgetbjzz2018-0980.

[10] CHRISTOPHER-HAYES N J，HAYNES S C，KENYON N J，et al. Asthma and memory function in children［J］. JAMA Netw Open，2024，7（11）：e2442803. DOI：10.1001/jamanetworkopen.2024.42803.

[11] DONG C. Cytokine regulation and function in T cells［J］. Annu Rev Immunol，2021，39：51-76. DOI：10.1146/annurev-immunol-061020-053702.

[12] 杨瑾禹，丁圣刚，张素丽，等.标准化变应原皮下特异性免疫治疗对单一与多重过敏性哮喘儿童的疗效对比［J］.安徽医科大学学报，2023，58（7）：1200-1204. DOI：10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.07.023.

[13] LUO W H，HU J D，XU W F，et al. Distinct spatial and temporal roles for Th1，Th2，and Th17 cells in asthma［J］. Front Immunol，2022，13：974066. DOI：10.3389/fimmu.2022.974066.

[14] 廖成松，韩阳阳，陈志婧.黑种草保健茶水浸液对OVA诱导小鼠过敏性哮喘的作用［J］.中成药，2021，43（9）：2514-2519. DOI：10.3969/j.issn.1001-1528.2021.09.046.

[15] 唐徐韵，陈盼碧，杜狄佳，等.基于p38 MAPK信号通路探讨穴位埋线对哮喘大鼠肺组织Th1/Th2失衡及EOS的影响［J］.中国中医基础医学杂志，2023，29（1）：86-90. DOI：10.19945/j.cnki.issn.1006-3250.2023.01.017.

[16] 吴星，刘爽，周长江，等.槐杞黄颗粒联合异丙托溴铵吸入气雾剂对哮喘患者的临床疗效［J］.中成药，2022，44（2）：422-427. DOI：10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.015.

[17] 张丽娟，任苓苓，王令敏，等.宣肺解痉方治疗支气管哮喘的临床疗效及对血清TGF-β1、MMP-9、TNF-α水平的影响［J］.辽宁中医杂志，2022，49（4）：50-54. DOI：10.13192/j.issn.1000-1719.2022.04.015.

[18] 王晶华，刘聪聪，潘璐，等.儿童过敏诊治研究进展［J］.中国实用儿科杂志，2019，34（11）：954-962. DOI：10.19538/j.ek2019110618.

[19] 陈智荷.过敏性疾病与注意力缺陷多动障碍研究进展［J］.贵州医药，2017，41（4）：420-423. DOI：10.3969/j.issn.1000-744X.2017.04.037.

[20] 刘昱含，张艺馨，宋一讷，等.基于血脑屏障完整性探讨神经源性炎症疾病中星形胶质细胞与T细胞互作［J/OL］.中国免疫学杂志，2024（2024-03-09）. https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.r.20240306.1600.004.html.

[21] 王芳，王丽春，韩彩玲，等.血管内皮生长因子调节蛋白激酶C表达对子宫内膜异位症间质细胞侵袭性的影响［J］.宁夏医科大学学报，2024，46（8）：757-764. DOI：10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2024.08.001.

[22] KOWIAŃSKI P，LIETZAU G，CZUBA E，et al. BDNF：a key factor with multipotent impact on brain signaling and synaptic plasticity［J］. Cell Mol Neurobiol，2018，38（3）：579-593. DOI：10.1007/s10571-017-0510-4.

[23] BELLO-MEDINA P C，PRADO-ALCALÁ R A，RIVAS-ARANCIBIA S. Effect of ozone exposure on dendritic spines of CA1 pyramidal neurons of the dorsal hippocampus and on object-place recognition memory in rats［J］. Neuroscience，2019，402：1-10. DOI：10.1016/j.neuroscience.2019.01.018.

[24] 高守连，国生，李莹君，等.振腹推拿手法对抽动障碍模型大鼠纹状体及皮质区神经营养因子水平的影响［J］.环球中医药，2024（11）:2170~2175.

[25] 曹若菡，李珊珊，郭耀东.捏脊疗法联合穴位点按对小儿功能性消化不良的护理干预研究［J］.商洛学院学报，2024，38（4）：76-80，96. DOI：10.13440/j.slxy.1674-0033.2024.04.012.

（收稿日期：2024-07-18；修回日期：2024-09-06）

（本文编辑：李卫霞）